

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月16日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570070

研究課題名（和文） 縫線核セロトニン神経によるエストロゲン受容体発現調節

研究課題名（英文） Control of estrogen receptor expression by serotonergic neurons in the raphe nuclei.

研究代表者

山内 兄人（YAMANOCHI KOREHITO）

早稲田大学・人間科学学術院・教授

研究者番号：10053357

研究成果の概要（和文）：脳内神経細胞におけるエストロゲン受容体 α （ER α ）の変動は生殖機能の制御に重要な働きをしている。ER α はエストロゲにより減少するが、脳の部位と雌雄により違いがあること、また、ER α の発現が縫線核セロトニン神経によっても抑制されている可能性を本研究で示唆した。セロトニン神経そのものにも雌雄差があり、セロトニン神経は運動ストレスによる排卵周期の異常を抑さえること、排卵周期など脳機能の性分化に ER α の働きが重要であることも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Change of estrogen receptor α (ER α) in the neurons of the brain is an important to control reproductions such as ovulatory cycle in rats. In this experiment, it has been shown that degree of down-regulation of ER α by estrogen is different among regions of the brain or sexes, and ER α plays an important role in sexual differentiation of the brain functions. Furthermore, expression of ER α is influenced by serotonergic neurons. Serotonergic neurons itself have a sex difference and have a role to prevent irregular ovulatory cycle induced by a physical stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
23年度	1,200,000	360,000	1,560,000
22年度	1,100,000	330,000	1,430,000
21年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、形態・構造

キーワード：神経内分泌

1. 研究開始当初の背景

- (1) セロトニン神経は下位脳幹の縫線核群を中心に豊富に存在し、脳と脊髄のほとんどの部位に神経線維を送っている。
- (2) 縫線核群は排卵、性行動、妊娠、授乳、母性行動など雌ラットのすべての生殖機能の制御に影響を持つことが明

らかになっている。

- (3) 脳内の生殖機能制御に関わる部位にはエストロゲン受容体 α が豊富に見られる。
- (4) 脳内エストロゲン受容体発現の変動はその部位のエストロゲンに対する感受性を変化させる。

- (5) しかし、セロトニン神経によるエストロゲン受容体発現の制御は全く明らかにされていないことから、そこを明らかにするために研究計画を立てた。

2. 研究の目的

- (1) エストロゲン受容体 α (ER α) の基礎データの取得

- ①生殖機能に関わる脳内部位のER α 発現に対する部位と雌雄による違いの解明。
②脳の性分化におけるエストロゲン受容体 α と β の働きの違いの解明

- (2) セロトニン神経に関わる基礎データ取得。

- ①脳内セロトニン神経の性質に対する部位差と性差解明
②縫線核セロトニン神経の出生後の発達解明。
③セロトニン神経とストレスによる排卵周期異常の関係解明

- (3) セロトニン神経とエストロゲン受容体の関係の分析

- ①セロトニン神経、縫線核による脳内ER α 発現の制御解明
②セロトニン神経による排卵機能の制御解明

3. 研究の方法

- (1) エストロゲン受容体 α (ER α) の脳内発現についての基礎データ取得

- ①雌雄生殖腺除去ラットにエストロゲン、または溶媒を投与し、24時間後に脳を摘出、凍結切片のER α 免疫染色後、ER α 免疫要請細胞数を計測した。
②出生直後の雌ラットにER α とER β の作動剤を投与し、成長後の排卵周期の有無、雌性行動であるロードーシスの発現を調べる。

- (2) セロトニン神経に関わる基礎データ取得。

- ①雌雄生殖腺除去ラットにセロトニン合成素材剤を投与し、中脳と延髄の縫線核のセロトニン免疫要請細胞数を計測する。
②出生直後から思春期前までのラットの縫線核をセロトニン免疫染色し、セロトニン免疫陽性細胞数、形態を観察する。
③縫線核を破壊した雌ラットを電動輪回しにかけ、強制運動による排卵周期異常を調べる。

- (3) セロトニン神経とエストロゲン受容体の関係の分析

- ①卵巣除去ラットのセロトニン合成阻害剤

を投与し、生殖機能に関わる神経核のER α 免疫陽性細胞数を測定する。

- ②卵巣除去ラットのセロトニン合成阻害剤を投与し、生殖機能に関わる神経核のER α 免疫陽性細胞数を測定する。

4. 研究成果

研究目的で示した(1)から(3)に沿って行なった結果をここに示す。

- (1) エストロゲン受容体 α (ER α) の基礎データ

- ①生殖機能に関わる脳内部位のER α 発現に対する部位と雌雄による違いの解明。雌雄生殖腺除去ラットに1mg E2を投与し24時間後脳を固定し前腹側脳室周囲核 (AVPV) 視床下部腹内側核外内側部 (VMNv1)、弓状核 (ARCN) と中脳中心灰白質外側部 (1MCG) のエストロゲン受容体 α (ER α) の免疫陽性細胞数を測定した。雄の前腹側脳室周囲核 (AVPV) と中脳中心灰白質外側部 (1MCG) では低下が少なく、雌では大きいことが示され、エストロゲンに対する受容体発現に反応性の性差、部位差があることが明らかになった。神経核それぞれにエストロゲン受容体発現の制御に違いがあることはそれぞれの機能解析の基盤となる重要な知見である (雑誌論文④)。

- ②脳の性分化におけるエストロゲン受容体 α と β の働きの違いの解明。齧歯類の場合、脳機能の性分化は男性ホルモンが脳神経細胞内でエストラジオールに変換されて作用する。しかし、エストロゲン受容体サブタイプのどれが重要か直接的な証拠はなかった。出生5日 (出生日=1日) にER α の特異的アゴニストであるPPTかER β のアゴニストDPNを100~500 μ g/10gbw投与すると、成長後、PPT投与の雌の性周期はほとんど異常になり、DPN投与では投与濃度が高い場合は異常が生じた。性行動に関しては、PPTを投与した雌ラットのロードーシスは低下したが、DPN投与では対照群と違いがなかった。したがって、新生期におけるエストロゲンによる排卵周期形成の阻害はER α を介して生じ、ER β も何らかの形で関わっていることが示された。一方、ロードーシスの低下はER α が中心で、ER β は関与していないと考えられる。脳機能の性分化機序解析の基盤となる重要な知見である (雑誌論文①)。

(2) セロトニン神経に関わる基礎データ

- ①脳内セロトニン神経の性質に対する部位差と性差解明。セロトニン神経細胞体は縫線核群に集中しているが、縫線核によるセロトニン神経の性質の違いについては全く報告がない。本研究ではセロトニン合成阻害剤PCPAを投与した雌雄生殖腺除去ラットの縫線核群のセロトニン免疫陽性細胞数を計測した。その結果、雌の背側および正中縫線核セロトニン免疫陽性細胞数は対照群とほぼ同じであるが、雄では対照群より少なくなった。また、延髄の大縫線核では雌雄とも低下しなかった。このように縫線核のセロトニン神経の性質に部位差、雌雄差が見られたことは、セロトニン機能解析の基盤となる重要な知見である。また、性差医療が意識されるようになってきたが、セロトニン神経に関わる疾病に際して、男女の違いを考えた薬品の投与の必要性を示唆するものである（雑誌論文③）。
- ②縫線核セロトニン神経の出生後の発達解明。縫線核セロトニン神経の出生後の発達に関して、正中縫線核のセロトニン免疫陽性細胞数の密度は5日齢から成獣より多いほどであったが、背側縫線核では15日成獣の量になった。縫線核によりセロトニン神経細胞機能の成熟に違いがあることが示され、それぞれの機能でのセロトニン神経の役割が明らかになりつつある。
- ③強制運動ストレスに対する縫線核セロトニン神経の役割。ストレス反応は脳内の正常なメカニズムが阻害された状態である。運動過多により性周期が異常になり排卵しなくなることは知られているが、脳内のストレス応答のメカニズムを解明するために、ラットにおいてそのモデル実験を考えた。4日周期の正常なメスラットを、電動輪回し装置に一日30分入れ、15日間それを継続して、性周期の変化を見た。その結果、背側縫線核と正中縫線核を高周波破壊し、強制走行させると、対照群より多くのラットが性周期異常になり、異常になるのも早かった。中脳の縫線核が運動ストレスから排卵機能を護っていることが示唆されたことになる。脳におけるストレス防御システムを初めて示した実験である。この方法で、強制運動ストレスだけではなく、いろいろなタイプのストレスに対する脳内メカニズムを調べることができる（雑誌論文②）。

(3) セロトニン神経とエストロゲン受容体の関係の分析

- ①脳内ER α 発現に対するセロトニン神経の働き。脳内セロトニンの変動がER α 発現にどのような影響を及ぼすか、卵巣除去ラットにセロトニン合成阻害剤PCPAを投与し、生殖機能制御に関わっているAVPV, VMNv1, ARCNのER α 免疫陽性細胞数を測定した。その結果、VMNv1とARCNではER α 免疫陽性細胞数に溶媒投与群と違いが見られなかったが、AVPVではER α 免疫陽性細胞数が多い傾向になった。この結果は、セロトニン神経により排卵周期形成に関わるAVPVのエストロゲンに対する感受性が受容体発現を介してコントロールされている可能性を示唆するものである。まだ結果は孵化時網のものであり、今後例数増加や薬品の量を変えた追試をする必要がある。
- ②脳内ER α 発現に対する縫線核の役割。卵巣除去ラットの背側縫線核を高周波破壊して、1週間後に脳を固定し、AVPV, VMNv1, ARCNのER α 免疫陽性細胞数を測定した。その結果、破壊群のAVPVのER α 免疫陽性細胞数が脳の非破壊群より高い傾向を示したが、他の部位では違いが見られなかった。セロトニン合成阻害剤投与と全く同じ結果が得られ、背側縫線核のセロトニン神経がAVPVの機能をコントロールしている可能性は高い。しかし、実験は十分ではなく、継続していく必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ①Moeko Kanaya and Korehito Yamanouchi, Defeminization of Brain Functions by a Single Injection of Estrogen Receptor α or β Agonist in Neonatal Female Rats. Neuroendocrinology 査読有 2012 in press
- ②Hideo Shimizu and Korehito Yamanouchi, Acceleration of irregular estrous cycle in forced running by midbrain raphe lesions in female rats. Neuroscience. Letter 査読有 495 (3),192-195, 2011
- ③Hiroyuki Ito and Korehito Yamanouchi, Sex and regional differences in decrease of serotonin-immunoreactive cells by paracholorophenylalanin in rat raphe nuclei. Neuroscience. Research 査読有 67 (1),33-39, 2010

- ④Shunji Yamada, Daisuke Noguchi, Hiroyuki Ito and Korehito Yamanouchi. Sex and regional differences in decrease of estrogen receptor α -immunoreactive cells by estrogen in rat hypothalamus and midbrain. *Neuroscience Letter* 査読有 463 (2),135-139, 2009
- ⑤山内兄人・塚原伸治, ロードーシス神経制御機構の性差. *クリニカル ニューロサイエンス*, 査読無 27 (10) 1120-1123, 2009
- ⑥山内兄人・掛山正心, ロードーシス制御における GABA_A と GABA_B 受容体. *生体の科学*, 査読無 60 (5) 382-383, 2009

[学会発表] (計 20 件)

- ①発表者: Moeko Kanaya., .Effects of ER α and β agonists, estrogen and androgen on number of ER α -immunoreactive cells in the hypothalamus of female rats. The 8th World Congress of Neuroscience, July 14-18, 2011, Florence, Italy
- ②発表者: Yuji Shimogawa. Effects of unilateral lesion of ventromedial hypothalamus on densities of estrogen receptor α -immunoreactive cells in intact side. The 8th World Congress of Neuroscience, July 14-18, 2011, Florence, Italy
- ③発表者: Yuji Shimogawa. Increase of estrogen receptor α -immunoreactive cells in intact side of ventromedial hypothalamic nucleus by unilateral lesion. 第 34 回日本神経科学学会大会、2011 年 9 月 14-17 日、横浜
- ④発表者: 金谷萌子, 雌ラット視床下部 ER α 免疫陽性細胞数への ER α , β 作動剤、性ステロイド投与効果 動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 21-23 日、旭川
- ⑤発表者: 金谷萌子, 雌ラットの脳機能の雄性化に対するエストロゲン α , β 受容体作動剤新生期投与効果 第 16 回日本生殖内分泌学会、2011 年 11 月 19 日、東京。
- ⑥発表者: 山内兄人, ロードーシス行動と性差、第 3 回ラットリソース・リサーチ研究会、2010 年 11 月 29 日、京都
- ⑦発表者: 山内兄人 ロードーシス行動抑制力と 40 年日本行動神経内分泌研究会、鋤鼻研究会合同集会、2011 年 6 月
- ⑧発表者: Hiroyuki Ito, Effects of serotonin-synthesis inhibitor, parachlorophenylalanine, on number of estrogen receptor alpha immunoreactive cells in gonadectomized female and male rats. The 7th International Congress of Neuroendocrinology, July 12, 2010, Rouen, France.
- ⑨発表者: Moeko Kanaya. Defeminizing and masculinizing effects of single injection with estrogen receptor alpha or beta agonist in neonatal female rats. The 7th International Congress of Neuroendocrinology, July 12, 2010, Rouen, France
- ⑩発表者: Ayako Ogata., Effects of single injection of phytoestrogens or estrogen receptor alpha and beta agonists on uteri in ovariectomized rats. The 7th International Congress of Neuroendocrinology, July 14, 2010, Rouen, France
- ⑪発表者: Bungo Yamamuro, Effects of septal cuts on intermale aggressive behavior in castrated or non-castrated males. The 7th International Congress of Neuroendocrinology, July 14, 2009, Rouen, France
- ⑫発表者: Moeko Kanaya. Effects of neonatally-treatment with ER alpha and ER beta agonists on estrous cycle and lordosis in female rats. 第 33 回日本神経科学学会大会、2010 年 9 月 2 日、神戸
- ⑬発表者: 緒方綾子, 雌ラット子宮に対する植物エストロゲンおよびエストロゲン受容体作動剤の影響、動物学会第 81 回大会、2010 年 9 月 23-25 日、東京
- ⑭発表者: 下川雄二, 視床下部腹内側核左側破壊による右側エストロゲン α 受容体免疫陽性細胞数の変化、動物学会第 81 回大会、2010 年 9 月 23-25 日、東京
- ⑮発表者: 金谷萌子, 雌ラット発情周期とロードーシスに対するエストロゲン受容体 α , β 作動剤新生期投与 動物学会第 81 回大会、2010 年 9 月 23-25 日、東京
- ⑯発表者: 清水英雄, 雌ラット運動負荷による性周期異常に対する中脳縫線核、前頭前野皮質の役割: 破壊効果 動物学会第 81 回大会、2010 年 9 月 23-25 日、東京
- ⑰発表者: Hiroyuki Ito: Sex difference of p-chlorophenylalanine-sensitivity in serotonin-immunoreactive cells in rat raphe nuclei. 16th International Congress Comparative Endocrinology June 22-26, 2009, Hong-Kong.
- ⑱発表者: Hideo Shimizu and Korehito Yamanouchi: Effect of mesencephalic raphe nuclei lesions on anovulation caused by over exercise stress in female rats, 16th International Congress Comparative Endocrinology June 22-26, 2009, Hong-Kong.
- ⑳発表者: 山内兄人, 脳機能の性分化: 性行動と母性行動、第 161 回つくばブレインサイエンス・セミナー、2009 年 4 月 28 日、つくば
- ㉑発表者: 山内兄人, 動物の本能行動から脳の性差を考える、2009 年日仏春秋講座「男の脳・女の脳—脳に性差はあるのか」2009 年 5 月 16 日、東京
- ㉒発表者: 伊藤広幸、セロトニン合成阻害剤投与ラットにおける縫線核セロトニン免

疫陽性細胞数の性差、動物学会第 80 回大会、2009 年 9 月 17 日、静岡

⑳発表者：Hideo Shimizu. Acceleration of anovulatory condition in over exercise by midbrain raphe lesions in female rats. 第 3 2 回日本神経科学大会、2009 年 9 月 18 日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内兄人 (Yamanouchi Korehito)

研究者番号：

10053357

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し